

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 45/06	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/09653 (43) Date de publication internationale: 12 mars 1998 (12.03.98)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: **PCT/FR97/01567**(22) Date de dépôt international: **5 septembre 1997 (05.09.97)**(30) Données relatives à la priorité:
96/10875 6 septembre 1996 (06.09.96) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): **SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) [FR/FR]; 51/53, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).**

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): **CHABRIER de LAS-SAUNIÈRE, Pierre-Etienne [FR/FR]; 75 bis, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). BIGO, Denis [FR/FR]; 8, rue Neuve, F-91190 Gif sur Yvette (FR).**(74) Mandataire: **BOURGOIN, André, S.C.A.F., Service Brevets et Marques, 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).**(81) Etats désignés: **AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: **ASSOCIATION OF NO SYNTHASE INHIBITORS WITH TRAPPERS OF OXYGEN REACTIVE FORMS**(54) Titre: **ASSOCIATION INHIBITEURS DE NO SYNTHASE ET PIÈGEURS DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGÈNE**

(57) Abstract

The invention concerns a pharmaceutical composition containing, as active principle, at least one NO synthase inhibiting substance and at least one oxygen reactive form trapping substance, optionally with a pharmaceutically acceptable support. The invention also concerns a product containing at least one NO synthase inhibiting substance and at least one oxygen reactive form trapping substance as combined product of these active principles in separate form.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, éventuellement avec un support pharmaceutiquement acceptable. L'invention a également pour objet un produit comprenant au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison sous forme séparée de ces principes actifs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LJ	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BV	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CY	République centrafricaine	JP	Japon	NI	Niça-Bas	VN	Viet Nam
CC	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Caméroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**ASSOCIATION INHIBITEURS DE NO SYNTHASE
ET PIEGEURS DES FORMES REACTIVES
DE L'OXYGENE**

L'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable. L'invention concerne également un produit
5 comprenant au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, de ces principes actifs.

Une composition pharmaceutique et un produit selon l'invention sont intéressants dans le traitement de pathologies où le monoxyde d'azote et les formes réactives de
10 l'oxygène sont impliquées, et notamment :

. les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires comprenant, par exemple, l'athérosclérose, la migraine, l'hypertension artérielle, le choc septique, les infarctus cardiaques ou cérébraux d'origine ischémique ou hémorragique, les ischémies et les thromboses ;

15 . les troubles du système nerveux central ou périphérique comme, par exemple, les maladies neurodégénératives où l'on peut notamment citer les infarctus cérébraux, les démences séniles, y compris la maladie d'Alzheimer, la chorée de Huntington, la maladie de Parkinson, la maladie de Creutzfeld Jacob, les maladies dues aux prions, la sclérose latérale amyotrophique mais aussi la douleur, les traumatismes cérébraux ou
20 de la moëlle épinière, l'addiction aux opiacés, à l'alcool et aux substances induisant une accoutumance, les troubles de l'érection et de la reproduction, les désordres cognitifs, les encéphalopathies, la dépression, l'anxiété, la schizophrénie, l'épilepsie, les troubles du sommeil, les troubles alimentaires (anorexie, boulimie...) ;

. les maladies prolifératives et inflammatoires comme, par exemple, l'athérosclérose,
25 l'hypertension pulmonaire, la glomérulonéphrite, l'hypertension portale, le psoriasis, l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde, les fibroses, les amyloïdoses, les inflammations du système gastrointestinal (colite, maladie de Crohn) ou du système pulmonaire et des voies aériennes (asthme, sinusites) ;

- . les diarrhées, les vomissements y compris ceux d'origine autochoïde, les irradiations radioactives, les radiations solaires (UVA, UVB) ;
- . les transplantations d'organes ;
- . les maladies autoimmunes et virales comme par exemple le lupus, le sida, les infections parasitaires et virales, le diabète, la sclérose en plaque, les myopathies ;
- 5 le cancer ; et
- . toutes les pathologies caractérisées par une production ou un dysfonctionnement de monoxyde d'azote et/ou des formes réactives de l'oxygène.

- Dans l'ensemble de ces pathologies, il existe des évidences expérimentales démontrant
- 10 l'implication du monoxyde d'azote ou des formes réactives de l'oxygène (Kerwin et al., Nitric oxide : a new paradigm for second messengers, J. Med. Chem. 38, 4343-4362, 1995 ; Halliwell B., Gutteridge JMC., Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Oxford, Clarendon Press, 1989). C'est le cas notamment de l'infarctus cérébral expérimental qui illustre l'invention (Buisson et al, The neuroprotective effect
- 15 of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal ischemia., Br J Pharmacol. 106, 766-767, 1992 ; Nowicki et al, Nitric oxide mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia in the mouse, Eur. J. Pharmacol. 204, 339-340, 1991 ; Zhao et al, Delayed treatment with the spin trap α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats, Acta. Physiol. Scand.,
- 20 1994 ; Schulz et al, Improved therapeutic window for treatment of histotoxic hypoxia with a free radical spin trap, J. Cereb. Blood Flow Metabol. 15, 948-952 (1995)). Dans ce contexte, les médicaments pouvant inhiber la formation du monoxyde d'azote ou des formes réactives de l'oxygène peuvent apporter des effets bénéfiques. Aucune association de ces deux principes actifs, à savoir un inhibiteur de NO synthase et un
- 25 piègeur de formes réactives de l'oxygène, n'a été réalisée. Comme cela est exposé dans la partie expérimentale, ces deux principes actifs agissent de manière synergique. En effet, ces deux principes actifs administrés à des doses subactives (c'est-à-dire à des doses qui ne produisent pas par elles-mêmes d'effet thérapeutique), produisent, lorsqu'ils sont associés, un effet thérapeutique hautement significatif.
- 30 L'avantage de cette association est de diminuer de façon importante les doses de chacun des principes actifs et ainsi de diminuer considérablement leurs effets indésirables tout en gagnant de l'efficacité thérapeutique. Cette invention est particulièrement bien illustrée dans un modèle pathologique expérimental de neurodégénération : l'ischémie cérébrale avec reperfusion.

L'invention a donc pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.

- 5 L'invention a plus particulièrement pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, une substance inhibitrice de NO synthase et une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène.

Dans le terme inhibiteur de NO synthase, il faut comprendre tout inhibiteur spécifique ou non spécifique de l'une de ses isoformes qu'elle soit constitutive (neuronale ou
10 endothéliale) ou inducible (Kerwin et al., Nitric oxide : a new paradigm for second messengers, J. Med. Chem. 38, 4343-4362, 1995).

Dans le terme piègeur de formes réactives de l'oxygène, il faut comprendre toute substance chimique ou enzymatique capable de s'opposer ou de piéger les ou l'une des formes réactives de l'oxygène telles que $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} , ONO_2^{\cdot} , NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot}
15 ou H_2O_2 (Halliwell B., Gutteridge JMC., Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Oxford, Clarendon Press, 1989). Ces substances peuvent être naturelles ou synthétiques et posséder des propriétés antioxydantes. (Santrucek and Krepelka, Antioxidants - Potential chemotherapeutic agents Drugs Future 13, 975-996, 1988 ; Jackson et al, Antioxidants : a biological defense mechanism for the prevention of
20 atherosclerosis, Med. Res. Reviews 13, 161-182 (1993) ; Aruoma, Characterization of drugs as antioxidant prophylactics, Free Rad. Biol. Med. 20, 675-705 (1996)).

Dans une composition pharmaceutique selon l'invention, l'inhibiteur de NO synthase et le piègeur des formes réactives de l'oxygène peuvent se présenter sous forme séparée ou sous forme combinée en formant un sel. De préférence, le sel est formé à
25 partir d'un dérivé de la substance inhibitrice de NO synthase contenant au moins un groupe basique et d'un dérivé de la substance piègeur de formes réactives de l'oxygène contenant au moins un groupe acide. Ainsi des sels peuvent être formés, selon les méthodes connues de l'homme de l'art, à partir des inhibiteurs de NO synthase comme par exemple les amidines, les guanidines, les pyridines ou les
30 pipéridines telles que définies ci-après, et les piègeurs de formes réactives de l'oxygène comme par exemple les acides phénoliques tels que définis ci-après, et plus particulièrement l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, l'acide caféïque, l'acide sinapinique ou l'acide gallique.

- L'invention a également pour objet un produit comprenant au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, pour une utilisation simultanée ou séquentielle dans le traitement de pathologies dans lesquelles
- 5 le monoxyde d'azote et les formes réactives de l'oxygène sont impliquées telles que les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires, les troubles du système nerveux central ou périphérique, les maladies prolifératives et inflammatoires, les transplantations d'organes, les maladies autoimmunes et virales, le cancer et toutes les pathologies caractérisées par une production ou un dysfonctionnement de monoxyde
- 10 d'azote et/ou des formes réactives de l'oxygène.

Dans une composition pharmaceutique ou un produit selon l'invention, l'inhibiteur de NO synthase et le piègeur de formes réactives de l'oxygène peuvent se présenter à des doses qui peuvent être identiques ou différentes. Les dosages sont choisis en fonction des composés associés à des diluants ou excipients appropriés.

- 15 L'inhibiteur de NO synthase et le piègeur de formes réactives de l'oxygène peuvent être administrés de manière simultanée ou séquentielle, par la même voie d'administration ou par des voies différentes, suivant qu'ils se présentent sous forme séparée ou combinée. De préférence, les voies d'administration sont orale, parentérale ou topique.
- 20 Parmi les inhibiteurs de NO synthase, on peut définir les composés de type amino-acide et non amino-acide. Les inhibiteurs de NO synthase de type amino-acide peuvent être des composés tels que décrits dans les demandes WO95/00505, WO94/12163, WO96/06076 et EP230037 incorporées par référence dans la présente demande, ou bien des dérivés de la L-arginine, de l'ornithine ou de la lysine tels que décrits dans les
- 25 demandes WO93/24126, WO95/01972, WO95/24382, WO95/09619 et WO95/22968, incorporées par référence dans la présente demande.

Les inhibiteurs de NO synthase de type non amino-acide, peuvent être des composés de la familles des guanidines, des isothiourées, des nitro- ou cyano-aryles, des aminopyridines ou amino-pyrimidines, des amidines, des indazoles ou des imidazoles.

- 30 Les guanidines inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés tels que définis dans les demandes WO95/28377, WO91/04023, WO94/21621, WO96/18607 et WO96/18608 incorporées par référence dans la présente demande.

Les isothiourées inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés tels que définis dans les demandes WO95/09619, WO96/09286, WO94/12165, WO96/14842,

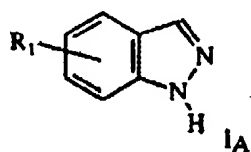
WO96/18607, WO96/18608, WO96/09286, EP717040 et EP718294 incorporées par référence dans la présente demande.

Les nitro- ou cyano-aryles inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés tels que définis dans la demande WO94/12163, incorporée par référence dans la présente
5 demande.

Les amino-pyridines ou amino-pyrimidines inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés tels que définis dans les demandes WO94/14780, WO96/18616 et WO96/18617 incorporées par référence dans la présente demande.

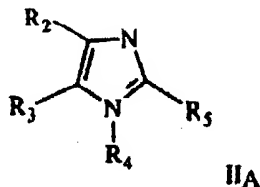
10 Les amidines inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés tels que définis dans les demandes WO95/11014, WO96/01817, WO95/05363, WO95/11231, WO96/14844 et WO96/19440 incorporées par référence dans la présente demande, ou des composés tels que la N-phényl-2-thiophénecarboximidamide.

Les indazoles inhibiteurs de NO synthase peuvent être des composés de formule générale IA



dans laquelle R₁ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, le radical nitro, halo, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur.

Les imidazoles inhibiteurs de NO synthase peuvent être les composés de formule générale IIA

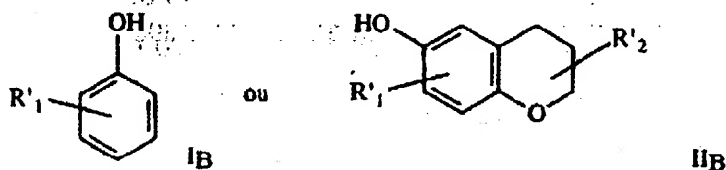


dans laquelle R₂ et R₃ représentent, indépendamment l'atome d'hydrogène, le radical halo, hydroxy, amino, alkyl ou alkoxy, ou R₂ et R₃ sont liés ensemble et forment le radical phényle condensé avec le cycle imidazole, le radical phényle étant éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi les radicaux
25 hydroxy, trifluorométhyle, halo, carboxy, alkyle inférieur, alkoxy inférieur ou

alkényle inférieur; R₄ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, amino, alkyle inférieur amino ou phényle, le radical phényle étant éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi les radicaux hydroxy, trifluorométhyle, halo, carboxy, alkyle inférieur, alkoxy inférieur ou alkényle inférieur; R₅ représente l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, amino, alkyle inférieur amino.

Les piègeurs de formes réactives de l'oxygène peuvent être choisis parmi l'acide ascorbique, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène (Hao Chen et al, Free Radical Biology and Medicine 18 (5), 949-953 (1995)), le coenzyme Q10 (S. Tereao et al., J. Org. Chem., 44, 868 (1979)) ou les composés captodatifs (H.G. Viehe et al., Acc. Res., 18, 148-154 (1985), incorporée par référence dans la présente demande). Les piègeurs de formes réactives de l'oxygène peuvent également être choisis parmi les composés phénoliques, les nitrones, des dérivés de l'indole, des imidazoles ou des carbazoles, ou bien également être les enzymes capables de neutraliser les ou l'une des formes réactives de l'oxygène telles que les superoxydes dismutases, les catalases ou les glutathions peroxydases et leurs mimétiques.

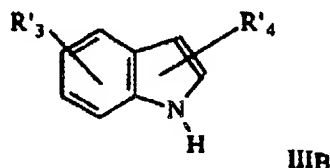
Parmi les composés phénoliques piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer le probucol ; l'ubiquinone ; les dérivés du tocophérol, à savoir l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol ou les flavonoïdes phénoliques (R. A. et al, Phytochemistry, 20 27(4), 969-978 (1988), incorporée par référence dans la présente demande). Les composés phénoliques piègeurs des formes réactives de l'oxygène peuvent également être choisis parmi les composés de formule générale Ib ou IIb



25 dans laquelle R₁ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux hydroxy, halo, carboxy, alkyle inférieure, alkoxy inférieur, alkényle inférieur ou alkoxy carbonyle, les radicaux alkyle, alkoxy et alkényles étant éventuellement substitués par un radical hydroxy, halo, carboxy ou amino ; et R₂ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène ou les radicaux alkyle inférieur éventuellement substitué, alkoxy inférieur, hydroxy, halo, amino ou carboxy.

Les nitrones piègeurs de formes réactives de l'oxygène peuvent être les composés tels que définis dans les demandes WO96/15110, WO88/05044 et le brevet US5310916 incorporés par référence dans la présente demande.

Les dérivés de l'indole piègeurs des formes réactives de l'oxygène, peuvent être des composés de formule générale III B



dans laquelle R'3 représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux hydroxy, halo, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ; R'4 représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux halo, hydroxy, amino, carboxy ou alkylcarbonylaminoalkyle.

Les dérivés de l'indole piègeurs des formes réactives de l'oxygène, peuvent être également des composés tels que définis dans la demande WO96/26941.

Parmi les imidazoles piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer de préférence l'imidazole elle-même ou la cimétidine.

15 Parmi les carbazoles piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer le 4-hydroxycarbazole ou le carvedilol.

Tel qu'il est utilisé ici, le terme inférieur en référence aux groupes alkyle et alkoxy désigne des groupes hydrocarbonés aliphatiques saturés, linéaires, ou ramifiés, comportant de 1 à 6 carbones comme, par exemple, méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, t-butyle, méthoxy et éthoxy. En référence aux groupes alkényle, le terme inférieur désigne des groupes comportant 2 à 6 atomes de carbone et une ou plusieurs doubles ou triples liaisons comme, par exemple, les groupes vinyle, allyle, propényle, isopropényle, pentényle, butényle, hexanyle, propényle et butadiényle. Le terme halo signifie chloro, bromo, iodo ou fluoro.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que

- l'inhibiteur de NO synthase est choisi parmi la L-nitro-arginine (LNA), l'ester méthylique de la L-nitro-arginine (LNAME), la L-N-monométhylarginine (LNMMA),

l'aminoguanidine, l'agmatine, la 2-amino-1-(méthylamino)benzimidazole, le 5-nitro-indazole, 6-nitro-indazole, le 7-nitro-indazole, le 1,2-(trifluorométhylphényl)imidazole (TRIM), la 2-amino-4-méthyl-6-(2-aminoéthyl)pyridine, la 2-iminopipéridine, la 2-iminohomopipéridine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-thiazine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-oxazine, la N-phényl-2-thiophénecarboximidamide, la 2-iminotétrahydropyrimidine, la S-éthylisothiourée, la S-méthyl-L-thiocitrulline ou la S-éthyl-L-thiocitrulline ; et

- le piègeur de formes réactives de l'oxygène est choisi parmi le probucol, l'ubiquinone, l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénol, le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol, l'eugénole, le trolox, le gallate de n-propyle, le tempole, l'acide caféïque, l'acide sinapinique, l'acide gallique, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylique, la mélatonine, l'acide 5-hydroxyindole-2-carboxylique, l'imidazole, la cimétidine, l'acide ascorbique, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le 9-[2-(4-morpholinyl)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9H-pyrimido[4,5-b]indole, le 4-hydroxy-carbazole ou le carvedilol.

Les composés inhibiteurs de NO synthase et piègeurs de formes réactives de l'oxygène sont commerciaux ou peuvent être préparés par les méthodes connus de l'homme de l'art (ou par analogie à ces dernières) (P. Hamley et al, Bioorganic and medicinal chemistry letters, vol.5 (15), 1573-1576 (1995) ; W. M. Moore et al, J. Med. Chem., 39, 669-672 (1996) ; E. P. Garvey et al., The Journal of Biological Chemistry, vol.269(43), 26669-26676 (1994)).

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

PARTIE EXPÉRIMENTALE :

Soit A l'inhibiteur de NO synthase et B le piègeur de formes réactives de l'oxygène.

Exemple 1

Composé AB, combinaison des principes actifs A et B sous forme de sel, dans lequel A et B sont en quantité équimolaire avec comme composé A : l'aminoguanidine, inhibiteur des NO synthases inductibles, et comme composé B : l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés.

Exemple 2

Composé AB, combinaison des principes actifs A et B sous forme séparée, avec comme composé A : le 7-nitroindazole, inhibiteur des NO synthases constitutives de type neuronal, et comme composé B : l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés.

Exemple 3

Composé AB, combinaison des principes actifs A et B sous forme séparée et administrée par des voies différentes, avec comme composé A : la N^Onitro-arginine, inhibiteur puissant des NO synthases constitutives et inductibles, et comme composé B : l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés.

Etude pharmacologique des produits de l'invention

Les composés de l'invention ont été soumis à quelques tests biologiques *in vitro* et *in vivo*, afin de prouver leur activité à bloquer la NO synthase (constitutive et inductible) et à piéger les radicaux libres. Leur activité a été évaluée sur un modèle d'ischémie cérébrale focale chez le rat. Dans ce modèle considéré comme un modèle d'infarctus cérébral sévère proche de la situation clinique chez l'homme, une libération excessive de monoxyde d'azote et de formes réactives de l'oxygène a été démontrée ainsi que l'effet partiellement protecteur d'inhibiteur de NO synthase ou de piègeur des formes réactives de l'oxygène. Les effets de l'association ont été comparés à ceux produits par un traitement avec l'inhibiteur de monoxyde d'azote ou le piègeur des formes réactives de l'oxygène seul. L'association d'un inhibiteur de NO synthase et d'un piègeur des formes réactives de l'oxygène montre un effet protecteur hautement significatif sur l'ischémie cérébrale focale alors que l'effet de l'inhibiteur de NO synthase ou du piègeur des formes réactives de l'oxygène pris séparément et aux doses utilisées n'est pas significatif. Ceci prouve la synergie entre l'inhibiteur de NO synthase et le piègeur des formes réactives de l'oxygène.

1) Effet *in vitro* sur la NO synthase constitutive de cervelet de rat

Le test consiste à mesurer la transformation par la NO synthase de la L-arginine en L-citrulline. Des cervelets de rats Sprague-Dawley (300 g - Charles River) sont prélevés rapidement, disséqués à 4° C et homogénéisés dans un volume de tampon

d'extraction (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, pepstatin A 10 mg/ml, leupeptine 10 mg/ml), centrifugés à 21 000 g pendant 15 min à 4° C. Le dosage se fait dans des tubes à essai en verre dans lesquels sont distribués 100 µl de tampon d'incubation contenant 100 mM d'HEPES, pH 7,4, 2 mM d'EDTA, 2,5 mM de CaCl₂, 2 mM de dithiothréitol, 2 mM de NADPH réduit et 10 µg/ml de calmoduline. On ajoute 25 µl d'une solution contenant 100 nM d'arginine tritiée (activité spécifique : 56,4 Ci/mmol, Amersham) et 40 µM d'arginine non radioactive. La réaction est initiée en ajoutant 50 µl d'homogénat, le volume final étant de 200 µl (les 25 µl manquants sont soit de l'eau, soit le produit testé). Après 15 min, la réaction est stoppée avec 2 ml de tampon d'arrêt (20 mM d'HEPES, pH 5,5, 2 mM d'EDTA). Après passage des échantillons sur une colonne de 1 ml de résine DOWEX, la radioactivité est quantifiée par un spectromètre à scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en valeur de CI₅₀ et sont résumés dans le tableau du paragraphe 2 (première colonne de résultats intitulée "NO synthase constitutive, formation de citrulline").

2) Effet *in vitro* sur la NO synthase inductible de macrophages murins J774A1

Les macrophages murins J774A1 produisent une grande quantité de monoxyde d'azote après activation par les lipopolysaccharides (LPS) et l'interféron-γ (IFN-γ). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ après activation par le LPS et l'IFN-γ. Elles sontensemencées à raison de 5000 cellules/cm² dans des flacons de 150 cm². Les incubations se font en présence de LPS (1 µg/ml) et d'IFN-γ murin (50 U/ml) dans du DMEM enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal. La NO synthase est isolée avec un tampon d'extraction (HEPES 50 mM, pH 7,4, dithiothréitol 0,5 mM, pepstatin A 1 mg/ml, leupeptine 1 mg/ml, inhibiteur de trypsine de soja 1 mg/ml, antipaine 1 mg/ml et PMSF 10 mg/ml). Après sonication dans le tampon d'extraction à 4° C, les homogénats sont ultra-centrifugés (100 000 g à acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque 4° C pendant 1 h). Le protocole est ensuite identique à celui de la NO synthase de cervellet exceptée la composition du tampon d'incubation (100 mM d'HEPES, pH 7,4, 1 mM de dithiothréitol, 2,5 mM de CaCl₂, 10 µM de tétrahydrobioptérine, FAD 10 µM, BSA 1 mg/ml, 2 mM de NADPH réduit). Les résultats sont exprimés en valeur de CI₅₀ et sont résumés dans le tableau du paragraphe 2 (deuxième colonne de résultats intitulée "NO synthase inductible, formation de citrulline").

3) Effet *in vitro* sur la production de nitrites par les macrophages murins J774A1

Ce test est utilisé pour mesurer l'activité inhibitrice des produits sur la NO synthase inductible de cellules en culture. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂. Pour les expériences, elles sont réparties en plaques 96 puits (50 000 cellules par puits) et incubées dans du DMEM sans rouge de phénol à 10 % de sérum de veau foetal avec du LPS (1 µg/ml) et de l'IFN-γ murin (50 U/ml) en présence ou en absence des produits à tester. Après 48 heures, la concentration de nitrites dans les milieux de culture, produits de dégradation du monoxyde d'azote, est mesurée par une méthode colorimétrique selon Green et al, (Analytical Biochemistry, 126, 131-138 (1982)). Les résultats sont exprimés en valeur de CI₅₀ et sont résumés dans le tableau du paragraphe 2 (troisième colonne de résultats intitulée "NO synthase inductible, formation de nitrites").

	CI ₅₀ (µM)		
	NO synthase constitutive (formation de citrulline)	NO synthase inductible (formation de citrulline)	NO synthase inductible (formation de nitrites)
Exemple 1			
A	> 300	29	22
AB	> 300	57	26
Exemple 2			
A	0,9	25	51
AB	0,9	25	51

4) Effet *in vitro* sur la formation des anions superoxydes

L'activation des cellules macrophagiques J774A1 par du phorbol myristate acétate (PMA) entraîne la production d'anions superoxydes en quelques minutes. Ces anions superoxydes peuvent oxyder un substrat luminescent, le luminol. Cette réaction génère des photons dont la production est mesurée à l'aide d'un chemiluminomètre. Les effets des produits sur la production d'anions superoxydes sont testés en incubant les cellules J774A1 à 37° C en présence de PMA, des produits à tester et du luminol. Les résultats sont exprimés par la valeur de CI₅₀.

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	270,4 ± 30,05	-
2	233 ± 30,15 NS	13,8
3	250,9 ± 37,86 NS	7,1
4	89,6 ± 22,42 **	63,2

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

Composé de l'exemple 2 : 4 groupes d'animaux sont constitués :

- 5
- Groupe 1 : traité avec du sérum physiologique ;
 - Groupe 2 : traité avec A (10 mg/kg) ;
 - Groupe 3 : traité avec B (20 mg/kg) ;
 - Groupe 4 : traité avec AB (A : 10 mg/kg et B : 20 mg/kg).

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	270,4 ± 30,05	-
2	238,9 ± 27,08 NS	11,7
3	250,9 ± 37,86 NS	7,1
4	69,6 ± 37,86 **	74,3

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

Composé de l'exemple 3 : 4 groupes d'animaux sont constitués :

- 10
- Groupe 1 : traité avec du sérum physiologique ;
 - Groupe 2 : traité avec A (0,03 mg/kg i.v.) ;
 - Groupe 3 : traité avec B (20 mg/kg i.p.) ;
 - Groupe 4 : traité avec AB (A : 0,03 mg/kg iv et B : 20 mg/kg ip).

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	237,68 ± 31,51	-
2	238,14 ± 35,94 NS	0
3	222,9 ± 7,34 NS	6,2
4	136,5 ± 33,02 **	42,6

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	270,4 ± 30,05	-
2	233 ± 30,15 NS	13,8
3	250,9 ± 37,86 NS	7,1
4	89,6 ± 22,42 **	63,2

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

Composé de l'exemple 2 : 4 groupes d'animaux sont constitués :

- Groupe 1 : traité avec du sérum physiologique ;
 Groupe 2 : traité avec A (10 mg/kg) ;
 Groupe 3 : traité avec B (20 mg/kg) ;
 Groupe 4 : traité avec AB (A : 10 mg/kg et B : 20 mg/kg).

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	270,4 ± 30,05	-
2	238,9 ± 27,08 NS	11,7
3	250,9 ± 37,86 NS	7,1
4	69,6 ± 37,86 **	74,3

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

Composé de l'exemple 3 : 4 groupes d'animaux sont constitués :

- Groupe 1 : traité avec du sérum physiologique ;
 Groupe 2 : traité avec A (0,03 mg/kg i.v.) ;
 Groupe 3 : traité avec B (20 mg/kg i.p.) ;
 Groupe 4 : traité avec AB (A : 0,03 mg/kg iv et B : 20 mg/kg ip).

N° du groupe	volume de l'infarctus	% de protection
1	237,68 ± 31,51	-
2	238,14 ± 35,94 NS	0
3	222,9 ± 7,34 NS	6,2
4	136,5 ± 33,02 **	42,6

(NS: résultat non significatif ; ** : résultat très significatif)

Les résultats montrent que l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque utilisé comme piégeur des formes réactives de l'oxygène à la dose de 20 mg/kg est inactif pour protéger l'animal d'atteintes ischémiques de même que l'aminoguanidine (inhibiteur de NO synthase) est faiblement active. Par contre, l'association des deux composés

5 protège de manière hautement significative les animaux de l'ischémie.

De la même façon, le 7-nitroindazole utilisé en tant qu'inhibiteur de forme constitutive des NO synthases n'est pas significativement actif à la dose de 10 mg/kg ; par contre, associé à l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, une protection hautement

10 significative est observée. Cet effet protecteur montre une synergie entre les deux principes actifs.

De la même manière, la N^Gnitro-arginine utilisée en tant qu'inhibiteur des NO synthases et injectée par voie intraveineuse, n'est pas active à la dose de 0,03mg/kg. Par contre, lorsqu'elle est associée à une administration intrapéritonéale d'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, une protection hautement significative est observée.

15 Cet effet protecteur montre que la synergie entre les deux principes actifs est aussi observée lorsque les principes actifs sont administrés par des voies différentes.

REVENDICATIONS

- 1- Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.
- 5 2- Composition pharmaceutique selon la revendication 1, comprenant, à titre de principe actif, une substance inhibitrice de NO synthase et une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène.
- 3- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que la substance inhibitrice de NO synthase et la substance piègeur de formes réactives de l'oxygène sont sous forme séparée.
- 10 4- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que la substance inhibitrice de NO synthase et la substance piègeur de formes réactives de l'oxygène sont sous forme de sel.
- 5- Composition pharmaceutique selon la revendication 4, caractérisée en ce que le sel est formé à partir d'un dérivé de la substance inhibitrice de NO synthase contenant au moins un groupe basique et d'un dérivé de la substance piègeur de formes réactives de l'oxygène contenant au moins un groupe acide.
- 15 6- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle
- 20 - l'inhibiteur de NO synthase est un amino-acide et plus particulièrement des dérivés de la L-arginine, de l'ornithine ou de la lysine, ou un composé de la familles des guanidines, des isothiourées, des nitro- ou cyano-aryles, des amino-pyridines ou amino-pyrimidines, des amidines, des indazoles ou des imidazoles ; et
- 25 - le piègeur de formes réactives de l'oxygène est l'acide ascorbique, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, ou un composé de la famille des phénols, des nitrones, des dérivés de l'indole, des imidazoles, des carbazoles.
- 7- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle
- 30 - l'inhibiteur de NO synthase est choisi parmi la L-nitro-arginine, l'ester méthylique de la L-nitro-arginine, la L-N-monométhylarginine, l'aminoguanidine, l'agmatine, la 2-amino-1-(méthylamino)benzimidazole, le 5-nitro-indazole, 6-nitro-indazole, le

7-nitro-indazole, le 1,2-(trifluorométhylphényl) imidazole, la 2-amino-4-méthyl-6-(2-aminoéthyl)pyridine, la 2-iminopipéridine, la 2-iminohomopipéridine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-thiazine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-oxazine, la 2-iminotétrahydropyrimidine, la N-phényl-2-thiophénecarboximidamide, la S-éthylisothiourée, la S-méthyl-L-thiocitrulline ou la S-éthyl-L-thiocitrulline ; et

- le piègeur de formes réactives de l'oxygène est choisi parmi le probucol, l'ubiquinone, l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénole, le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol, l'eugénole, le trolox, le gallate de n-propyle, le tempole, l'acide 10 caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, la mélatonine, l'acide 5-hydroxyindole-2-carboxylique, l'imidazole, la cimétidine, l'acide ascorbique, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le 9-[2-(4-morpholinyl)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9H-pyrimido[4,5-b]indole, le 4-hydroxycarbazole ou le 15 carvedilol.

8- Produit comprenant au moins une substance inhibitrice de NO synthase et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison sous forme séparée, pour une utilisation simultanée ou séquentielle dans le traitement de pathologies dans lesquelles le monoxyde d'azote et les formes 20 réactives de l'oxygène sont impliquées telles que les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires, les troubles du système nerveux central ou périphérique, les maladies prolifératives et inflammatoires, les diarrhées, les vomissements, les irradiations radioactives, les radiations solaires, les transplantations d'organes, les maladies autoimmunes et virales, le cancer et toutes les pathologies caractérisées par 25 une production ou un dysfonctionnement de monoxyde d'azote et/ou des formes réactives de l'oxygène.

9- Produit selon la revendication 8, pour le traitement des troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires tels que l'athérosclérose, la migraine, l'hypertension artérielle, le choc septique, les infarctus cardiaques ou cérébraux d'origine ischémique ou 30 hémorragique, les ischémies et les thromboses.

10- Produit selon la revendication 8, pour le traitement des troubles du système nerveux central ou périphérique tels que les maladies neurodégénératives, la douleur, les traumatismes cérébraux ou de la moëlle épinière, l'addiction aux opiacés, à l'alcool et aux substances induisant une accoutumance, les troubles de l'érection et de la

reproduction, les désordres cognitifs, les encéphalopathies, la dépression, l'anxiété, la schizophrénie, l'épilepsie, les troubles du sommeil, les troubles alimentaires.

11- Produit selon la revendication 8, pour le traitement des maladies prolifératives et inflammatoires telles que l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire, la glomérulonéphrite, l'hypertension portale, le psoriasis, l'arthrose et l'arthrite rhumatoïde, les fibroses, les amyloïdoses, les inflammations du système gastrointestinal ou du système pulmonaire et des voies aériennes.

12- Produit selon la revendication 8, pour le traitement des maladies autoimmunes et virales telles que le lupus, le sida, les infections parasitaires et virales, le diabète, la sclérose en plaque, les myopathies.

13- Produit selon l'une de revendications 8 à 12, comprenant une substance inhibitrice de NO synthase et une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène.

14- Produit selon la revendication l'une des revendications 8 à 13, dans lequel

- l'inhibiteur de NO synthase est un amino-acide et plus particulièrement des dérivés de la L-arginine, de l'ornithine ou de la lysine, ou un composé de la familles des guanidines, des isothiourées, des nitro- ou cyano-aryles, des amino-pyridines ou amino-pyrimidines, des amidines, des indazoles ou des imidazoles ; et

- le piègeur de formes réactives de l'oxygène est l'acide ascorbique, la N-acétylcystéine, le β -carotène, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, ou un composé de la famille des phénols, des nitrones, des dérivés de l'indole, des imidazoles, des carbazoles, les superoxydes dismutases, les catalases ou les glutathions peroxydases.

15- Produit selon l'une des revendications 8 à 14, dans laquelle

- l'inhibiteur de NO synthase est choisi parmi la L-nitro-arginine, l'ester méthylique de la L-nitro-arginine, la L-N-monométhylarginine, l'aminoguanidine, l'agmatine, la 2-amino-1-(méthylamino)benzimidazole, le 5-nitro-indazole, 6-nitro-indazole, le 7-nitro-indazole, le 1,2-(trifluorométhylphényl) imidazole, la 2-amino-4-méthyl-6-(2-aminoéthyl)pyridine, la 2-iminopipéridine, la 2-iminohomopipéridine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-thiazine, la 2-imino-5,6-dihydro-1,3-oxazine, la 2-iminotétrahydropyrimidine, la N-phényl-2-thiophèncarboximidamide, la S-éthylisothiourée, la S-méthyl-L-thiocitrulline ou la S-éthyl-L-thiocitrulline ; et

- le piègeur de formes réactives de l'oxygène est choisi parmi le probucol, l'ubiquinone, l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3-5-di-tert-butyl-4-

hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénole, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxyphénol, l'eugénole, le trolox, le gallate de n-propyle, le tempole, l'acide caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, la mélatonine, l'acide 5-hydroxyindole-2-carboxylique, l'imidazole, la cimétidine, l'acide ascorbique, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le 9-[2-(4-morpholinyl)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9H-pyrimido[4,5-b]indole, le 4-hydroxy-carbazole ou le carvedilol.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 97/01567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K45/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GALLEY H F ET AL: "Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: Effect of antioxidants" FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, 21 (1). 06-1996. 97-101., XP000672950 see abstract	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 1997

Date of mailing of the international search report

19/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Leherte, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Déma internationale No
PCT/FR 97/01567

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K45/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GALLEY H F ET AL: "Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: Effect of antioxidants" FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, 21 (1). 06-1996. 97-101., XP000672950 voir abrégé	1-15

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 décembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 3616 Patenteen 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Leherte, C